

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Humán SGBS sejtvonal jó modell adipociták
“browning” folyamatának tanulmányozására**

Klusóczki Ágnes

Témavezető: Prof. Dr. Fésüs László



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2019

Humán SGBS sejtvonal jó modell a zsírsejtek “browning” folyamatának tanulmányozására

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Klusóczki Ágnes**
okleveles biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Prof.Dr. Fésüs László, akadémikus

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora
Prof. Dr. Tretter László, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet
diskussziós terme, 2018. október 3. 10:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Vas Virág, PhD
Dr. Törőcsik Dániel, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Dr. Vas Virág, PhD
Dr. Törőcsik Dániel, PhD
Dr. Kvell Krisztián, PhD
Dr. Lontay Beáta, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2020. február 6. 11:00

1. BEVEZETÉS

1.1. Elhízás

Az elhízás és a túlsúly olyan szisztémás betegségként meghatározott állapot, amely rendellenes és túlzott mértékű testzsír felhalmozódást mutat, mely egészségkárosodáshoz vezet. Az elhízás számos betegség rizikófaktor, mint a szívbetegségeknek, az inzulin rezisztenciának, a kettes típusú cukorbetegségnek (T2DM), a magas vérnyomásnak és a daganatok bizonyos típusainak, melyek az elhalálozás legfőbb okai lehetnek. A testtömeg-index (BMI) megegyezik a testtömeg kilogrammban kifejezett mértékével, osztva a magasság méterben megadott négyzetével (kg/m^2). A World Health Organization (WHO) szerint az alábbi osztályokat különböztetjük meg: egészséges (BMI: 18.5-24.9 kg/m^2), túlsúlyos (BMI: 25-29.9 kg/m^2) és kövér (BMI: $>30 \text{ kg/m}^2$). Európában, több mint a lakosság fele túlsúlyos, és 30%-uk elhízott, továbbá az elhízás gyakorisága 1980-óta megduplázódott. Magyarországon a számok nagyon hasonlóak, a lakosság 60%-a túlsúlyos és közülük több mint 50%-a valóban elhízott. Közismert tény, hogy sok esetben az elhízás megelőzhető, bár az elhízás patogenezise rendkívül összetett, és még a mai napig kutatott terület. Az elhízás legfontosabb oka azonban az energiaegyensúly hosszú távú rendellenessége, amely csökkent energiafelhasználást és megnövekedett energiafelvételt jelent. Kevés adat és korlátozott számú gyógyszer áll rendelkezésre, amelyek hatékonyak lehetnek az elhízás hatékony kezelésében. A neuroendokrin szabályozás meghatározott összetevőire, például a leptinre vagy a neuropeptidekre irányuló gyógyszer-fejlesztések eddig még sikertelenek voltak. A zsírszövet funkcióira összpontosító új alternatívák azonban a jövőben terápiás szempontból relevánsak lehetnek. A zsírszövet egy komplex szerv, mely hatással van az élettani és kórélettani folyamatokra, étkezést követően kalóriát tárol, és éhezéskor a szabad zsírsavak forrása. Ez azonban az első olyan szövet, amely az elhízás során elsőként kóros változásokat szenved. Hagyományosan kétféle zsírszövetet különböztetünk meg: barna zsírszövet, amely többnyire barna adipocitákat tartalmaz, és fehér zsírszövet, amely a

fehér zsírsejtekből áll. A fehér zsírszövet energia raktárként funkcionál, trigliceridek formájában tárol zsírsavakat, melyeket éhezés során szabadít fel. A barna zsírszövet a fehér zsírszövettel ellentétben nem az energiaraktározásban, hanem, a zsírsavakból származó kémiai energia hőenergiává töréntő átalakításában játszik fontos szerepet.

1.1.1. Fehér zsírszövet

A fehér zsírszövet egy heterogén szövet, amely különféle sejttípusokat tartalmaz a sztrómális vaszkuláris frakcióban (SVF): endotélsejtek, fibroblasztok, preadipociták, makrofágok és hisztociták. Azon kívül, hogy energiatárolóként működik, a fehér zsírszövet úgy viselkedik mint egy endokrin szerv: fontos szerepet játszik az élettani funkciók modulálásában, mint például az energiafelhasználás, immunitás, gyulladás, étvágy vagy inzulinérzékenység. Ezenkívül a fehér zsírszövet számos fontos fehérjét szekretál, például: leptin, adiponektin, rezisztin, tumornekrózis faktor-alfa (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), angiotenzinogén és egyéb fehérjék. A fehér zsírszövet a bőr alatti kötőszövetben (szubkután zsírszövet), valamint a zsigerek között (viszcerális zsírszövet) helyezkedhet el. A szubkután fehér zsírszövet fontos szerepet játszik a bőr fertőzések elleni védelmében, emellett megakadályozza a hővesztést és védi a testet a külső mechanikai stresszel szemben.

1.1.2. Barna zsírszövet

A barna zsírszövet terápiás jelentőségére összpontosító tanulmányok száma az elmúlt évtizedben jelentősen növekedett. Az emlősökben kétféle termogén zsírsejt létezik: a klasszikus barna és "beige" adipociták. Evolúciósan a barna adipociták csak a placentális emlősökben jelennek meg. Az emberi csecsemőknek jelentős mennyiségű barna zsírsejtjeik vannak, hogy hőt biztosítsanak a hideg környezetben a születés utáni időszakban. Korábban azt feltételezték, hogy a felnőtt emberekben hiányzik a barna zsírszövet, addig amíg hideg vagy katekolaminerg stimulus alá nem vetették őket. A klasszikus barna zsírszövet jelentőségét felnőtt emberekben

a ^{18}F -FDG radioaktívan jelzett anyagcsere-szubsztrátok segítségével bizonyították. Ilyen vizsgálatokat főként rákdiagnosztikában használnak, mint például a PET/CT, használatukkal pozitív BAT-raktárokat tártak fel, elsősorban a betegek supraclavularis és gerinc körüli régiójában. Pozitív PET/CT eredményeként az adott régiókat UCP-1 immunhisztokémiai analízisekkel vizsgálták. Termogenikusan aktív zsírraktárakra fókuszáló tanulmányok kimutatták, hogy a barna zsírszövet aktivitása évente több, mint 4kg súlyvesztésért felelős. A barna zsírszövet aktivitásának potenciális előnye lehet egy terápiás megközelítés, mellyel csökkenhet a triglicerid tartalom és segítséget nyújthat az emberek elhízás elleni küzdelme terén.

1.2. Barna és „beige” zsírsejtek fejlődése

Régóta feltételezték, hogy a barna és a fehér adipociták közös prekuzorral rendelkeznek, mivel a két sejttípus között nagyszámú hasonlóság van. Mindazonáltal az elmúlt évtized során szerzett adatok azt mutatták, hogy a klasszikus barna zsír kapcsolatban van a miocitákkal, és közös miogén faktor 5 pozitív (Myf5+) prekuzorból származnak. Emellett azt feltételezik, hogy az indukálható ”beige” adipociták a fehér zsírsejtekkel együtt egy különálló, Myf5- vonalból származnak. Azonban néhány tanulmány kimutatta, hogy a fehér és „beige” zsírsejtek mindkét vonalból származhatnak, mivel Myf5+ prekuzorokat is találtak a fehér zsírszövetben. A „beige” zsírsejteket aktiválhatjuk hideg vagy más induktor hatására, azonban ha megszűnik a hideg stimulus, ezen sejtek ismét inaktívvá válnak és a fehér zsírsejtekéhez hasonló morfológiát mutatnak.

1.2.1. Klasszikus barna zsírsejtek eredete

Annak ellenére, hogy a fehér és barna adipociták fejlődési eredete eltér, mindkét differenciálódási útvonalat hasonló transzkripciós kaszkádokvezérlik. Elsőként, a PPAR γ , amely fontos szerepet játszik mind a fehér és a barna zsírsejtek differenciációjában. Másik

szabályzó elem a C/EBP család, mely részt vesz az adipogén gének kifejeződésének aktiválásában és fenntartásában. A RIZ Homology Domain Containing Protein 16 (PRDM16), amely az emberi barna zsírszövetben megnövekedett mennyiségben van jelen a szubkután fehér zsírszövethez képest, kijelöli a barna zsírsejt identitást. Ez a fehérje transzkripció koaktivátorként működik, közvetlen interakcióba lép számos kulcsfontosságú adipogén transzkripció faktorral (PGC1- α , C/EBP β , PPAR α vagy PPAR γ). Ezenfelül átalakítja a fehér prekursor sejteket és mioblasztokat termogénikus, UCP1-et tartalmazó adipocitákká. A PRDM16 expressziója fehér zsírsejtekben nemcsak aktiválja a browning programot, hanem elnyomja a fehér vagy izom-irányú gén programokat. A PRDM16 és FOXC2 hatására indul be a hideg-indukált, cAMP-függő hosszú távú termogénikus folyamat, mely során a barna zsírsejtek differenciálódnak és fokozódik a barna zsírszövet vaszkularizációja. Ezen folyamat során emelkedik a PPAR γ Coactivator-1 α (PGC1 α) kifejeződése. A PGC1 α egy transzkripció koaktivátor, mely kapcsolatba lépve az IRF4-gyel és számos magreceptorral indukálja a mitokondriumok biogenezisét, meghatározó funkcióval bír a nem-didergéses hőtermelés beindításában.

1.2.2. A „beige” zsírsejtek eredete

A „beige” zsírsejtek nem ugyanazon prekursor sejtekből származnak, mint a klasszikus barna adipociták, mivel azok nem expresszálják a Myf5 gént. Bár számos tanulmány azt sugallja, hogy a felnőtt emberekben a termogén zsírszövet nagy része főleg „beige” sejtekből áll, az irodalomban csak korlátozott mennyiségű adatot találunk a „beige” adipociták származásáról és szabályozóiról. Úgy tűnik, hogy a „beige” zsírsejt indukció mechanizmusa eltérő az inguinális valamint az epididimális fehér zsírszövetben. Továbbá fontos kérdés, hogy a „beige” zsírsejtek fehér zsírsejtekből származnak-e transzdifferentiációs program eredményeként, vagy prekursor sejtek differenciálódásából valók. Számos vizsgálat egerekkel azt mutatta, hogy a „beige” sejteknek különböző

prekurzora van a klasszikus barna adipocitáktól, és a differenciálódási program számos stimulus (például hideg) hatására indukálódik, amelynek szabályozásában fontos szerepet játszik a β 3-adrenerg jelátvitel. Ezen indukálható sejtek főként preadipocitákból differenciálódnak, melyekben nagymértékben kifejeződik az EBF2 és a PDGFR α . A szubkután zsírszövetben differenciálódó és indukálható hőtermelésre képes zsírsejt populációt „beige” adipocitáknak nevezték el és a folyamat létrejöttét az irodalom „browning”-ként jelöli. Ha a termogenikus jel megszűnik, fehér-szerű „masked beige” adipociták maradnak vissza *in vivo*. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a „beige” zsírsejtek gyorsan képesek ki-bekapcsolni hőtermelő programjukat külső jelek hatására, és az adrenerg stimulusok szükségesek a termogenikus profil fenntartásához. Az energiát felszabadító „beige” és energiát tároló fehér zsírsejtek aránya, legalábbis részben, a mezenchimális előalak sejtek korai elköteleződési fázisában dől el. A folyamat szabályzásának egyik kulcslépését a közelmúltban írták le, amely hozzájárul a „beige” adipocita elköteleződés jobb megértéséhez. Az első genom asszociációs vizsgálatok rávilágítottak, hogy az FTO gén elhízásra hajlamosít. Egy T→C tranzíció (Rs1421085 pozícióban) meggátolja az ARID transzkripciós faktor családba tartozó fehérje bekötődését az adott pozícióba, mely hatással van a mezenchimális szuperenhancer régióra. Akik hordozzák ezen rizikó alléleket az FTO lókuszban, az adipocita prekursorok fehér zsírsejt differenciáció irányba indulnak el „beige” helyett, ezzel megnövekedett táplálék bevitelhez később elhízás is társul. Ezzel szemben, akik az egészséges genotípust hordozzák, egy represszor fehérje kötődik a mezenchimális szuperenhancer régióhoz, így az IRX3 és 5 transzkripciós faktorok kifejeződése csökken, mely a progenitor sejtek „beige” előalakokká való elköteleződését segíti elő, ezzel fokozva a hőtermelő képességet és csökkentve a lipidek raktározását. Továbbá kimutatták, hogy a „beige” zsírsejtek fejlődésének jelentős mértékű fokozódása neuro-endokrin vagy parakrin faktorok hatására is elérhető (irisin, noradrenalin).

1.3. Barna és „beige” zsírsejtek fejlődésének és funkciójának aktivátorai

A szimpatikus idegrendszer (SNS) részt vesz mind a barna adipociták fejlődésének, mind termogénikus funkciójának szabályozásában. Azt is dokumentálták, hogy a szimpatikus neuronok jelenléte a BAT-ban valószínűleg részt vesz a barna adipociták működésének szabályozásában. Az SNS-en keresztül a jel továbbításra kerül a barna zsírszövet irányába. Bizonyos ingerekre adott válaszként (például hideg expozíció esetén) noradrenalin (NE) szabadul fel a szimpatikus idegrendszerből, amely elsősorban a $\beta 3$ -adrenerg receptorokra hat. A $\beta 3$ -adrenerg receptorok kapcsolódnak az adenilil-ciklázhoz (AC), amely indukálja a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) termelődését, majd cAMP és PKA továbbítják a termogén szignált. A PKA-aktiváció közvetlenül stimulálja a lipolízist, és génexpressziós változásokhoz vezet (például UCP1-szabályozás). Számos rácsálókon végzett vizsgálat kimutatta a barna zsírszövet fokozott aktivitását és a fehér zsírszövet barnulását fizikai aktivitás hatására. Az elmúlt évtizedben fedezték fel az irisint, amelyet a vázizomzat termel fizikai aktivitás hatására és képes a szubkután fehér zsírszövetben "browning" programot indukálni.

1.4. UCP1

A barna zsírsejtek számos mitokondriális fehérjét, köztük UCP1-et tartalmaznak, melynek hatására proton visszaáramlás történik a mitokondrium mátrixába a terminális oxidáció és az oxidatív foszforiláció szétválasztásával. Az ATP termelés elmarad, viszont helyette hő keletkezik. Ezzel párhuzamosan, a BAT mitokondriumai nagy mennyiségben tartalmaznak mitokondriális légzési lánc komplexeket, viszont jelentősen csökkent mennyiségben az F1F0-ATP-szintáz. Ennek oka a nukleáris ATP5G1 gén alacsony expressziós szintje, amely a Fo oligomer mitokondriális membránhoz kötött c alegységét kódolja. Az UCP1 növeli IMM proton vezetőképességét, hogy eloszlassa a mitokondriális proton gradienst, és a szubsztrátok oxidációjának energiáját hővé alakítsa. Amikor a termogenezis fiziológiai szempontból szükséges, a NE a környező szimpatikus rostok által felszabadul, amely aktiválja a lipolízist,

ami növeli a szabad zsírsavak szintjét a barna adipocita mitokondriumokban. A hosszú szénláncú szabad zsírsavak (LCFA-k) nemcsak az oxidáció szubsztrátjai, hanem aktiválják az UCP1-et is, a hormon-szenzitív lipáz a citoplazmatikus lipidcseppek trigliceridjeiből hasítja őket a BAT β 3-adrenerg stimulációja során. LCFA az UCP1-hez kapcsolódik, míg az UCP1 H^+ vivőként működik az IMM-en keresztül, majd a protonok felszabadulnak a mitokondriális mátrixban. Ez a mechanizmus az energia felszabadításhoz vezet, amelyet főként a zsírsavak β -oxidációja generál, hő formájában.

1.5. „Browning” induktorok, amelyek közvetlenül a zsírszövetet célozzák meg

Bizonyos inger határása, pl. bone morphogenic protein-7 (BMP7), amelyről kimutatták, hogy fontos szerepet játszik a BAT kialakulásában, mind a klasszikus barna adipogenezist, mind pedig a „beige” adipocitákat toborozza. Ezenkívül a máj fontos szerepet játszik a barna zsírszövet aktiválásában. A fibroblast growth factor-21 (FGF21) indukálja a termogenikus programot barna adipocitákban, majd a mitokondriális szétkapcsolt légzést. Újszülöttekben, az FGF21 közvetlenül aktiválja a barna zsírszövet által generált hőtermelést, míg felnőttekben elősegíti a fehér zsírszövet barnulását. A szív szintén jelentős szerepet játszik a barna zsírszövet aktiválásában, nátriuretikus peptideket (NP-ket) termel, amelyek termogenezist indukálnak. Az IL-6 egy jól ismert, fizikai aktivitás hatására kibocsájtott miokin, amelyről kimutatták, hogy aktiválja a „beige” adipociták fejlődését, és egerekben fokozza az edzés által kiváltott fehér zsírszövet barnulását. Az IL-6 számos olyan szövetet megcéloz, mint a máj, a hasnyálmirigy, az agy, a fehér és barna zsírszövet, emellett egyensúlyt teremt a katabolikus útvonalak között a glikémiás kontroll szabályozásáért. Azonban az IL-6 hatása az emberi zsírsejtek differenciálódására továbbra sem tisztázott.

1.6. UCP1 független termogenikus mechanizmusok

A hőtermelő adipociták UCP1-független termogenikus mechanizmusokkal is rendelkeznek. Néhány évvel ezelőtt fedezték fel, hogy a kreatin metabolizmusban fellelhető szubsztrát ciklus

hozzájárul a “beige” sejtek mitokondriumaiban az energia leadáshoz. A ciklusban a mitokondriális kreatin-kináz 1 és 2 katalizálja a kreatin átalakulását foszfo-kreatinná (PCr), ATP-függő módon, ADP-t létrehozva. Ezt követően a PCr magas-energiájú foszfát csoportja felszabadul, ami hőtermelődéshoz vezet.

1.7. Zsír szövet által szekretált faktorok

Egyre több és több fehérjéről derül ki, hogy a zsír szövet által termelt és kibocsátott fehérje, és a fehér zsír szövet által szekretált faktorok listája több mint száz tagból áll. A leptin egy keringő hormon, amely zsír sejtek által szekretált, étvágy csökkentő hatású, a test tömeg egyik alapvető szabályozója. Ezenkívül a hipotalamuszon keresztül indukálja a barna zsír szöveti termogenezist. A fehér zsír szövet által szekretált adipokinek és gyulladásos citokinek közül sok mérsékelten expresszálódik a barna zsír szövetben is. A barna zsír szövet szekréciós profilja meglehetősen különbözik a fehér zsír szövet által szekretált termékektől, ami nem meglepő, hiszen rendkívül eltérő fiziológiai szerepet játszanak az energiaháztartásban. A barna és „beige” zsír sejtek autokrin módon képesek szekretálni olyan faktorokat, amelyek gátolják (sLR11) vagy serkentik a termogenikus aktivitást (FGF21, BMP8b, endotelin-1, IL-6, LPGDS). A barna zsír szövet termogenikus aktivitása serkenti az FGF21 expresszióját és kibocsátását, amelyet cAMP-mediált mechanizmus szabályoz. BMP8b-t elsősorban érett barna zsír sejtek termelik és expressziója fokozódik termogenikus és táplálkozási tényezők hatására, pl hideg vagy magas zsírtartalmú táplálkozás eredményeként. Az Angiopoietin-like 8 hideg hatására indukálódik barna zsír szövetben. Nemrégiben kimutatták, hogy a Neuregulin 4 (NRG4), amely az epidermális növekedési faktor család tagja, barna zsír sejtek által szekretált és zsír sejt differenciáció során indukálódik.

1.8. SGBS sejtek

A rágcslókkal végzett részletes vizsgálatokkal ellentétben csak korlátozott adatok állnak rendelkezésre azokról a szabályozó elemekről, amelyek az emberi barna vagy „beige” adipocita differenciálódást idézik elő. Ezért humán sejtvonal-modellekre van szükség, a barnulás kulcsfontosságú molekuláris elemeinek vizsgálatához, valamint olyan új farmakológiai kezelések célpontjainak megtalálásához, amelyek fokozhatják a barnulást. Egy nem immortalizált humán preadipocita sejtvonalat nemrég fejlesztettek ki kollaborációs partnereink, humán zsírsejtek tanulmányozására, nevezetesen a Simpson-Golabi-Behmel szindrómás betegből származó prekursor sejtek használatával. Az SGBS egy X-kromoszómához kapcsolt ritka, veleszületett túlnövekedési szindróma, amelyet pontmutáció vagy delécio okoz a glipikán-3 (*Gpc-3*) génben. Az SGBS sejtvonalat kiváló modellnek tartják fehér zsírsejt differenciáció tanulmányozására. Wabitsch és munkatársai továbbá kimutatták, hogy ezen sejtek nagyon hasonlóak a humán primer preadipocitákhoz differenciáció nélkül, továbbá *in vitro* differenciáltatott SGBS zsírsejtek funkcionálisan megkülönböztethetetlenek a humán érett zsírsejtektől.

1.9. Transzglutamináz 2 (TG2)

A multifunkcionális TG2 fehérje sokrétű sejtes lokalizációval rendelkezik, és szerepet játszik számos fiziológiai (a sejt túlélése - sejthalál folyamatainak szabályozása, migráció, sejtadhézió, proliferáció, szignál-transzdukció) valamint patológiai folyamatban (neurodegeneratív rendellenességek, cöliákia, gyulladásos betegségek, anyagcsere-betegségek, rák, fibrózis). Továbbá ismert, hogy a TG2 részt vesz számos sejttípus differenciálódási folyamatában. A TG2 szinte az összes sejtkompartimentben kifejeződik, például a mitokondriumokban, citoplazmában, sejtmagban és újrahasznosuló endoszómákban. Megtalálható a sejtfelszínen is, és nem klasszikus mechanizmusok útján szekretálódik az extracelluláris mátrixba. Korábban TG2 KO egérmodellt hoztak létre, a

TG2 komplex biológiai funkcióinak feltárására. A TG2 részt vett egy folyamatban a fagocitotikus és elhaló sejtek között, a szövet integritásának megőrzése érdekében. Továbbá a neutrofilek differenciációjához és a baktériumok elpusztításához is szükséges. Számos rendellenességet és fontos változást tártak fel részletesebb vizsgálatok, melyek stressz és kóros körülmények között történtek. A TG2 hiánya cukorbetegséghez, károsult sebgyógyuláshoz és autoimmunitáshoz vezetett.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Barna és „beige” zsírsejt differenciáció vizsgálata SGBS sejtvonalon

- génexpressziós analízissel
- lézer pásztázó citometria alkalmazásával
- sejtek funkcionális vizsgálata Seahorse méréssel

2. Irisin és BMP7 hatásának tanulmányozása SGBS sejteken

3. Az újonnan felfedezett kreatin-kináz/foszfátáz szubsztrát ciklus jelenlétének vizsgálata a hőtermelésben, SGBS zsírsejtekben (β -GPA használatával, Seahorse mérés alatt)

4. Annak tisztázása, hogy a „beige” differenciáció visszafordítható-e, vagy a sejtek megtartják-e „beige” morfológiájukat

5. Citokinek szekréciójának (Batokinek) vizsgálata differenciáltatott SGBS sejtekben

6. IL-6 szekréciójának hatásának vizsgálata differenciáltatott SGBS „beige” zsírsejtekben vagy primer humán adipocitákban

7. TG2 gén és fehérje expressziójának feltérképezése differenciáltatott fehér és „beige” SGBS sejtekben

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Etikai engedélyek

A betegek tájékoztatását követően, tájékozott beleegyezésüket aláírásukkal bizonyítva zsírszövet mintákból mezenchimális őssejteket izoláltunk (ADMSC). Minden humán sejt izolációs kísérleti protokollt eleget tett a Helsinki Deklarációban foglalt irányelveknek. A kutatási tervet, a szövetminták gyűjtését megelőzően a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága jóváhagyta (20571-2/2017/EKU).

3.2. Humán ADMSC-k izolálása és tényésztése

Az ADMSC izolálás során az esetleges kötőszöveti területektől szikével élesen leválasztottuk a zsírszövetet, melyből apró darabokat preparáltunk. 120U/ml kollagenáz (Sigma-Aldrich) kezeléssel, steril PBS-ben emésztettük a kötőszövetet egy órán keresztül 37°C-on, közben rázogattuk a mintát. 10 percig, 1300 rpm-en centrifutáluk a mintákat, majd a pelletet szuszpendáltuk növekedési tápfolyadékban: DMEM-F12 (Sigma-Aldrich) + 10% FBS (Gibco) + 1% penicillin-sztreptomycin (Sigma-Aldrich) + 33 µM biotin (Sigma-Aldrich) + 17 µM pantoténsav (Sigma-Aldrich). 6 lyukú sejtenyésztő vagy Ibidi 8 lyukú µ-slides plate-re szélesztettük a sejteket 37°C, 5% CO₂ tartalom mellett, 3x10⁴ sejt/cm² sűrűségben konfluens állapotig (Kristóf et al., 2015; és 2016). A Mycoplasma kontaminációt minden esetben PCR alapú analízissel kizártuk (Promokine).

3.3. Áramlási citométer: ADMSC-k karakterizálása

A differenciálatlan SGBS sejtek fenotípusának vizsgálatához multiparametriás analízist hajtottunk végre, felszíni antigen expresszió meghatározásával. A sejteket 0.025% tripszin-EDTA segítségével begyűjtöttük és egyszer mostuk tápfolyadékkal. A következő mosási lépéshez FACS puffert használtunk, majd inkubáltuk őket és 1%PFA/PBS-ben fixáltuk. A

vizsgálatot egy napon belül végeztük. A mintákból származó adatokat FACS Calibur BD áramlási citométer alkalmazásával detektáltuk és BD Multiset szoftver segítségével elemeztük.

3.4. Fehér és “beige” zsírsejt differenciáltság

Kísérleteink során ADMSC és SGBS preadipocitákkal dolgoztunk. Az SGBS sejteket kollaborációs partnereink biztosították, Pamela Fischer-Posovszky és Martin Wabitsch, akik korábban kifejlesztették ezen sejtvonalat.

Fehér zsírsejt differenciáció során négy napig a következő médiumban tenyésztettük a sejteket: DMEM-F12 + 33 μ M biotin + 17 μ M pantoténsav + 1% penicillin/sztreptomicin + 10 μ g/ml humán apo-transzferrin (Sigma-Aldrich) + 20 nM humán inzulin (Sigma-Aldrich) + 100 nM kortizol (Sigma-Aldrich) + 200 pM trijód-tironin (Sigma-Aldrich) + 2 μ M roziglitazon (Cayman Chemicals) + 25 nM dexametazon (Sigma-Aldrich) + 500 μ M 3-izobutil-1-metinxantin (Sigma-Aldrich). A negyedik napot követően a roziglitazont, dexametazont és 3-izobutil-1-metilxantint elhagytuk a fehér zsírsejt differenciációs tápfolyadékból [Fischer-Posovsky és mtsai, 2008; Sárvári és mtsai, 2014].

A PPAR γ -vezérelt „browning” zsírsejt differenciáltság során négy napig az alábbi médiumban történt a sejtek tenyésztése: DMEM-F12 + 33 μ M biotin + 17 μ M pantoténsav + 1% penicillin/sztreptomicin + 10 μ g/ml humán apotranszferrin + 0,85 μ M humán inzulin + 200 pM trijód-tironin + 1 μ M dexametazon + 500 μ M 3-izobutil-1-metilxantin. Az ötödik naptól kezdve a szérumot, a 3-izobutil-1-metilxantint és a dexametazont elhagytuk, majd 500 nM roziglitazont adtunk a tápfolyadékhoz [Elabd és mtsai, 2009]. Hosszú távú kísérleteink során azonos tenyésztési feltételeket alkalmaztunk 21 és 28 napon keresztül, vagy a fehér zsírsejt differenciációhoz alkalmazott tápfolyadékot használtuk, roziglitazon, 3-izobutil-metinxantin és dexametazon nélkül. Minden negyedik napon a differenciációs koktélt lecseréltük.

A teljes differenciáció alatt a sejteket minden tápfolyadék csere alkalmával 250ng/ml humán rekombináns irisinnel (Cayman Chemicals) illetve 50ng/ml BMP7-tel (R&D Systems) kezeltük (Raschke és mtsai., 2013; Kristóf és mtsai, 2015). Két hétig tartó differenciáció során vizsgáltuk az irisín és BMP7 rövid távú hatását is, 12 órán keresztül alkalmazva őket a differenciáció végén. Ahol jeleztük, a fent említett indukáló szereket növekvő koncentrációban alkalmaztuk, illetve a sejteket IL-6R alfa vagy IgG izotípus kontrollal kezeltük minden nap, a differenciáció teljes időtartama alatt, 5µg/ml koncentrációban.

Az NC9 rövid távú hatását vizsgáltuk, 9 órás kezelést alkalmazva a 2 hetes fehér és PPAR γ -mediált “browning” differenciációt követően, majd begyűjtöttük a sejteket. Párhuzamosan kíváncsiak voltunk az NC9 hosszú távú hatására is, így 21 napig tartó differenciáció alatt minden negyedik napon alkalmaztuk, amikor tápfolyadékot cseréltünk, majd 21 nap után begyűjtöttük a sejteket.

3.5. RNS izolálás és valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

A differenciálódott SGBS sejteket begyűjtöttük és Trizol reaggessal (Invitrogen Life Technologies) lizáltuk, az RNS kicsapása kloroformos extrakciót követően izopropanollal törént. A nukleáz mentes vízben feloldott RNS koncentrációját spektrofotométer segítségével lemértük majd cDNS-sé a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) által meghatározott összetevőkből elkészített Master Mix segítségével írtuk át. Az RT-qPCR a LightCycler 480 készüléken történt: 94°C-10s, majd 40-szer ismétlődik a ciklus: 94°C-12s, és 60°C-30s. A normalizált expressziót $2^{-\Delta C_t}$ vizsgált gén/ $2^{-\Delta C_t}$ háztartási gén képlet alkalmazásával számítottuk ki, ahol a háztartási gén a *Gapdh* volt (Taube és mtsai, 2015).

3.6. Mitokondriális (mt) DNS izolálása és mennyiségének meghatározása qPCR-ral

Teljes celluláris DNS-t a hagyományos fenol-kloroform módszer alapján izoláltunk a differenciálódott SGBS sejtekből, Trizol reagens használatával. Kvantitatív PCR során hígított DNS triplikátumokat használtunk, 10 µM-t mindegyik primerből

Humán mtDNS specifikus primerek:

forward 5'CTATGTCGCAGTATCTGTCTTTG-3'
reverse 5'-GTTATGATGTCTGTGTGGAAAG-3'

sejtmag specifikus primerek (SIRT1 gén):

forward 5'CTTTGTGTGCTATAGATGATATGGTAAATTG-3'
reverse 5'GATTAAACAGTGTACAAAAGTAG-3'

és Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-et (Thermo Scientific). LightCycler 480 készüléken az alábbi programot alkalmaztuk: 95°C-20perc, majd ezt követően 50-szer ismétlődik a következő ciklus: , 95°C - 15s, 58°C - 20s, 72°C - 20s. Az eredményeket a küszöbérték ciklus különbségekből számoltuk ki, a mitokondriális DNS-re és a sejtmag specifikus amplifikációra (Szántó és mtsai, 2011; Kristóf és mtsai, 2015; és 2016).

3.7. Antitestek és immunoblot

A differenciálódott SGBS adipocitákat és differenciálódás nélküli kontroll sejeket összegyűjtöttük és PBS-sel mostuk, majd a 5xLaemmli loadig pufferben lizáltuk és 10 percig forraltuk. Egyenlő mennyiségű fehérjét válaszottunk szét 12%-os SGS-poliakrilamid gélen. majd a fehérjéket PVDF membránra (Millipore) transzferáltuk, melyet 5%-os sovány tejporral blokkoltunk egy órán keresztül. Ezután a membránokat egy éjszakán keresztül, 4 °C-on kezeltük különböző antitestekkel: poliklinális anti-UPC1 (1:500, Sigma, U6382; 1:500, Thermo

Scientific, PA1-24894), monoklonális anti-UCP1 (1:1000, R&D Systems, MAB6158), anti-OXPHOS (1:1000, Abcam, UK, ab110411) és anti-TG2 (1:1000; Zedira). Loading kontrollként nyúl poliklonális antitestet használtunk: β -aktin (1:10000, Sigma, A2066). A mosási lépéseket követően, torma-peroxidáz (HRP)-konjugált anti egér/nyúl másodlagos antitesttel inkubáltuk a membránokat szobahőmérsékleten egy órán keresztül. Az immunoreaktív termékeket Immobilon Western kemilumineszcens szubsztrát (Millipore) segítségével tettük láthatóvá. A western blot denzitometriás elemzését ImageJ szoftver segítségével végeztük el.

3.8. Immunfluoreszcens festés

Az SGBS sejteket és hADMSC-ket Ibidi 8-lyukú mikro slidera helyeztük ki és az előzőekben leírtak szerint differenciáltattuk. A mérés napján PBS-sel mostuk a sejteket majd friss tápfolyadékot adtunk hozzá. Hoechst 33342-öt (Thermo Fischer Scientific) adtunk a sejtekhez, 20 percre. Következő lépésként PBS-sel mostuk a sejteket, majd 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk őket. Blokkolást követően anti-UCP1 antitestet adtunk hozzájuk (Sigma, U6382; 1:500), melyet 6 órán keresztül szobahőmérsékleten tartottunk. Másodlagos antitestként Alexa 488-cal jelölt kecske anti-nyúl IgG-t használtunk (Thermo Fischer Scientific). Az antitestek hozzáadása előtt és után is mosási lépéseket végeztünk (0,1%-os szaponin, PBS-ben, mellyel a sejtek permeabilizálása is megtörtént).

3.9. Lézer pásztázó citometriás (LSC) képalkotás

A sejtekről képek készítése iCys Research Imaging Cytometer segítségével történt, majd a képeket egy magas-felbontású automatizált sejt-felismerő protokollt alkalmazva, szoftver segítségével analizáltuk, melyet korábban Doan-Xuan és mtsai (2013) dolgoztak ki. A sejtek azonosítása sejtmagjuk alapján történt, melyet Hoeschst 33342-vel festettünk. Az optimális konfluenciájú területet alacsony felbontású, 10-szeres nagyítású objektívvel szkenneltünk (NA 0.30), 10 μ m-es szkennelési lépéssel. A magas felbontású képeket 40-szeres nagyítással (NA

0.75) és 0,25 μm -es szkennelési lépéssel kaptunk. A pixel méretét 0,25 μm x 0,245 μm x 40-szeres nagyításra állítottuk. A Lézer fényeket szétválasztottuk az alábbi módon: Viola dióda lézer 405 nm-en gerjesztette a Hoechst 33342-t, 488 nm-en argon-ion lézer segítségével az Alexa 488-at detektáltuk, míg a Nile Blue 633 nm-en He-Ne gázlézer által gerjesztődött. Az emittált fényt a különböző festékek esetében az alábbi sávszűrőkkel detektáltuk: Hoechst 450 \pm 20 nm, Alexa 488 530 \pm 15 nm és Nile Blue 650 \pm 15 nm. A dióda fotodetektorokkal mért áteső lézer fényből meghatároztuk a fényvesztéseget és az árnyékolt kontúr jelet, hogy a fényabszorpció, a fényszórás és a “texture” értékeiről információt nyerjünk. A képeket az alábbi automatikus sejtfelismerő szoftverek segítségével processzáltuk és elemeztük: iCys companion software (iNovator Application Development Toolkit, CompuCytte Corporation) és CellProfiler (The Broad Institute of MIT). A fent említett módszert használtuk a zsírsejtek meghatározására heterogén kultúrákban. A Hoechst-magfestés alapján először a sejtmagokat azonosítottuk. A sejtek lipidcsepp tartalmának meghatározásához „texture” analízist hajtottunk végre. A texture ábrán a „sum variance” összérték egy-egy sejtben a lipidcseppek méretéről ad felvilágosítást, még a másik tengelyen a sejtenkénti UCP1 fehérje tartalmat jeleníthetjük meg. Így az UCP1 intenzitásokat illetve a „texture sum variance” értékeket minden egyes sejtre meghatározhatjuk Cell Profiler „Fast Gentle Boosting” szoftver segítségével, azonosíthatjuk a fehér és „beige” adipocitákat illetve a differenciáltan sejteket. A „beige” adipocitákat úgy ismerjük fel, hogy ezek a sejtek kis lipidcseppeket tartalmaznak és nagymértékben fejezik ki az UCP1 fehérjét. Ezzel ellentétben a fehér zsírsejtek nagy lipidcseppeket akumulálnak azonban kevés UCP1-et tartalmaznak.

3.10. Az adipociták oxigén fogyasztásának meghatározása

A sejtek oxigénfogyasztását és extracelluláris acidifikációs rátáját XF96 oximéter (Seahorse Biosciences) alkalmazásával vizsgáltuk. SGBS sejteket és ADMSC-eket 96-lyukú XF96 assay plate-ken tenyésztettünk és differenciáltattuk. A mérés során meghatároztuk a differenciált

sejtek alapszintű oxigén fogyasztását és extracelluláris acidifikációs rátáját 30 percen keresztül, majd a sejteket dibutiril-cAMP egyszeri adásával (500 μ M koncentrációban) stimuláltuk az adrenerg hatást modellezve. Majd a stimulált oxigén fogyasztást 30 percenként detektáltuk, 6 órán keresztül. A zsírsejteket 2mM β -GPA-val (Sigma-Aldrich) kezeltük, a kreatin-szubsztrát ciklus gátlása céljából (Kazak és mtsai, 2015). Ezt követően proton csorgásos légzést mértünk, miután oligomycint (Enzo Life Sciences) 2 μ M koncentrációban adtunk a sejtekhez, így blokkolva az ATP-szintáz aktivitását. Végül a sejtek egy adag Antimycin A (10 μ M koncentrációban) (Sigma-Aldrich) kezelésben részesültek, mely után a mérés zajsztintje volt meghatározható. Az oxigén fogyasztási rátát (OCR) és az extracelluláris acidifikációs rátát (ECAR) az egyes lyukakban megtalálható fehérje mennyiségekre normalizáltuk (Kristóf és mtsai, 2016).

3. 11. Citokin termelés meghatározása

SGBS sejtekről a tápfolyadékot begyűjtöttük minden negyedik napon a tápfolyadék cserék alkalmával és a mintákat tároltuk, hogy megmérjük a kibocsátott citokinek szintjét. Az összegyűjtött sejtenyésző tápfolyadékokból ELISA DuoSet (R&D Systems) alkalmazásával megmértük a termelődött citokinek szintjét: IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF α és MCP-1 (Sárvári és mtsai 2014 és 2015).

3.12. Genotipizálás

A genotípus meghatározásához használt genomiális DNS-t az SGBS sejtekből GeneJET Genomic DNA Purification Kit-tel (Thermo Fischer) állítottuk elő. A vizsgálni kívánt Rs1421085 SNP vizsgálatához kvantitatív PCR-t végeztünk, melyhez a reakció mixet TaqMan genotyping master mix (Applied Biosystems) és Taqman Genotyping Assay (Applied Biosystems) készítettük el. A vizsgált genomi szakasz amplifikációjához primer párt terveztünk, melynek szekvenciái a következők:

Forward: 5'GATGACACACACCATGAGCC 3'
Reverse: 5'TAACAGTGGAGGTCAGCACA 3'

PCR amplifikációt követően a terméket NucleoSpin® Gel és PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) használatával tisztítottuk meg. A PCR termék tisztaságának ellenőrzésére 2%-os agaróz gélelektroforézist végeztünk. Végül a tisztított PCR termékből DNS szekvencia analízist hajtottunk végre Taq Dye-Deoxy Termination Cycle Kit (Applied Biosystems) és ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer kapilláris elektroforézis (Applied Biosystems) felhasználásával.

3. 13. Eredmények statisztikai értékelése

Minden vizsgálatot legalább három, egymástól független módon ismételtünk meg és minden mintából három technikai párhuzamost képeztünk. Az eredményeket átlag \pm SD formában fejeztük ki, a biológiai párhuzamosok számát minden esetben megjelenítettük. A minták normál eloszlásának vizsgálata Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk. Több csoport együttes statisztikai összehasonlításához egy szempontos variancia analízist (one-way ANOVA) alkalmaztunk, melyet Tukey post-hoc teszt követett. Két csoportot párosított, két-szélű Student-féle t-teszttel hasonlítottunk össze.

4. EREDMÉNYEK

4.1. SGBS sejtek felszínén hasonló markerek expresszálódnak mint a primer preadipocitákon, és heterozigóták az FTO Rs1421085 rizikó allélre nézve.

A felszíni antigén expressziójának multiparaméteres elemzését háromszínű áramlási citometriával végeztük. Megállapítottuk, hogy hematopoietikus/monocita markerek (CD34, CD47), endothel markerek (CD54), fibroblast markerek (CD73, CD90), integrinek és CAM (integrin $\beta 1$, CD44, CD325) expresszálódnak a differenciálatlan SGBS preadipociták felszínén. Összehasonlítottuk az SGBS preadipociták felszíni antigén expressziós mintázatát a humán szubkután zsírból izolált hADMSC sejtekkel. A CD34, CD44, CD146 és HLA-DR expressziós szintek magasabbak voltak az SGBS preadipocitákban, míg a CD105, CD49a és CD31 antigének alacsonyabban expresszálódtak a humán primer preadipocitákhoz képest. Ezután megvizsgáltuk az rs1421085 lókuszt C rizikó alléljának jelenlétét. DNS szekvenálás és a qPCR-alapú genotípus elemzés kimutatta, hogy az SGBS sejtek heterozigóták a C rizikó allél szempontjából.

4.2. Az SGBS preadipociták a tartós PPAR γ ligand és az irisin vagy a BMP7 kezelésére reagálnak, akár “beige”, akár klasszikus barna marker gének indukálásával.

Fehér és barna differenciációs protokolt alkalmaztuk az SGBS preadipociták differenciáltatásához. Általános barna zsírszövet markerek (*Ucp1*, *Cidea*, *Elovl3* és *Pgc1 α*), “beige” szelektív markerek (*Tbx1*, *Cited1*) klasszikus barna zsírszöveti differenciációs markerek (*Zic1*, *Pdk4*), barna transzkripció szabályzó marker *C/ebp β* , mitokondriális felhalmozódást jelző *Cyc1*, általános zsírszöveti marker (*Ppar γ* , *Lep*, *Fabp4*) génekre végeztünk expressziós vizsgálatot. A browning koktél nagymértékben indukálta az *Ucp1* mRNS expressziót. Hasonlóképpen, a humán rekombináns irisin vagy BMP7 jelenléte megnövekedett *Ucp1* mRNS expressziót eredményezett a fehér differenciálódási protokoll

során. Megállapítottuk, hogy a barna zsír specifikus gének, például a *Cidea*, *Elovl3* és *Pgc1a* mRNS szinten magasan expresszálódtak virisin hozzáadásakor, a fehér koktéllhoz. Ezzel szemben csökkent kifejeződést találtunk a fehér zsírszövet marker gén, *Leptin* esetében barna differenciációra adott válaszként.

A mitokondriális felhalmozódást jelző marker, *Cyc1* expressziós szintje szignifikánsan magasabb volt a barna adipocitákban, a fehérhez hasonlítva. Ezenkívül az irisin kezelés hasonló hatást eredményezett. A megnövekedett *Ucp1* expresszióval összhangban azt találtuk, hogy az irisin vagy a browning protokoll a *Tbx1* és a *Cited1* jelentős mértékű fel-regulálódását eredményezte, azonban a *Zic1* indukciója nem volt megfigyelhető. *Zic1* kifejeződése szignifikánsan emelkedett BMP7 hatására, míg a *Tbx1* indukcióját is megakadályozta browning koktél alkalmazása esetében. Érdekes módon a *Pdk4* hasonló génexpressziós mintázatot mutatott mint a “beige”-szelektív marker gének, *Tbx1* és *Cited1*.

4.3. Lézer pásztázó citometriás (LSC) képalkotás, a sejtek felismerése

Következő lépésben a fehér és barna SGBS sejtek morfolófiait karakereit valamint texture paramétereket és UCP1 fehérje tartalmat vizsgáltuk. Képalkotó analízist alkalmazva a sejteket sejtmagjuk alapján azonosítottuk, majd UCP1 és lipidcsepp szerkezetük alapján osztályoztuk. PPAR γ -vezérelt browning differenciációs koktélt alkalmazva 14 napon keresztül, magasabb UCP1-tartalmat találunk akár az egyes SGBS adipocitákban, akár az teljes sejtlizátumot tekintve, mint a fehér zsírsejtekben. Ezenkívül emelkedett UCP1 fehérje tartalmat detektálunk irisin vagy BMP7 hozzáadására adott válaszként. Ezután ábrázoltuk minden differenciált adipocita „texture sum variance” és UCP1 fehérje tartalmát. Eredményink azt mutatják, hogy a differenciálódott zsírsejtek továbbra is heterogének maradnak, függetlenül attól, hogy fehér vagy barna differenciációs protokollt alkalmaztunk. Ezenkívül jelentős mennyiségű zsírsejtet detektáltunk, amelyek barna zsírsejt jellemzőkkel bírtak, és a „texture sum variance” nem

csökkent szignifikánsan a browning indukció alatt, amelyet emelkedett UCP1 expressziós szinttel jellemeztünk.

4.4. Az SGBS sejtek differenciációja során a kreatin fosztát ciklus aktiválódásának hatására funkcionális “beige” adipociták alakulnak ki

A következő lépésben a humán SGBS sejtek funkcionális jellemzőit vizsgáltuk és meghatározzuk a mitokondriális OCR-t. A génexpressziós és morfológiai változásokkal összhangban a differenciálódott „beige” adipociták bazális OCR-je magasabb volt, mint a fehér zsírsejteké, amely a PPAR γ ligand/irisin/BMP7 hatására indukálódott. Ezután a sejtek egy löket sejt permeábilis dibutiril-cAMP kezelést kaptak, és azt tapasztaltuk, hogy a browning koktéllal differenciált zsírsejtek bazális és stimulált mitokondriális légzése magasabb volt, mint a fehér adipocitáké. Ezzel párhuzamosan szignifikánsan emelkedett extracelluláris acidifikációs rátát (ECAR) detektáltunk mind a kezeletlen mind a cAMP-stimulált barna zsírsejtekben. Továbbá megvizsgáltuk a kreatin szubsztrát ciklus részvételét a differenciált zsírsejtek anyagcseréjében, β -GPA kezelést alkalmazva, amely ezen ciklus gátlószere. Eredményeink azt mutatják, hogy a browning indukált sejtek tovább növelik energia-leadásukat a kreatin szubsztrát ciklus bekapcsolásával, és ez a trend figyelhető meg az irisin vagy BMP7 kezelt fehér zsírsejtek esetében is. Ez azt sugallja, hogy a kreatin szubsztrát ciklus jelen van és aktív a barnult SGBS zsírsejtekben.

4.5. A barna /”beige” zsírsejt fenotípus fenntartható a differenciálódott SGBS sejtekben, PPAR γ -ligand hiányában

Következő lépésben vizsgálni kívántuk, hogy a PPAR γ -mediált “browning” differenciáció által eredményezett “beige” fenotípus fenntartható-e a PPAR γ ligand hiányában. Hosszú távú (28 napos) kísérletet terveztünk, azonban a sejtek egy részét a 14. napon begyűjtöttük. A többi sejt esetében a differenciáció 14. napján a “browning” koktélt fehérre cseréltük, ezáltal a

roziglitazon hatást megszüntetve differenciáltattuk tovább a sejteket 7 (B14,F7) vagy 14 (B14,F14) napig. mRNS szinten az *Ucp1* legnagyobb mértékben a 28.napon fejeződött ki. Amikor a “browning” koktélt fehérre cseréltük, további differenciáltatás eredményeként a 14.napon begyűjtött mintához viszonyítva *Ucp1* szintje tovább emelkedett, (B14,F7), majd a 14.napon detektálható értékre visszacsökkent (B14,F14). Fehérje szinten megállatítottuk, hogy az UCP1 enyhe mértékben expresszálódik a barnult sejtekben 14 napos differenciációt követően. További roziglitazon stimuláció (B21,B28) tovább fokozta az UCP1 fehérje expressziót. Amikor a “browning” koktélt fehérre cseréltük, a 14. napon (B14) detektált UCP1 expresszióhoz képest emelkedést tapasztaltunk (B14,F7), azonban további fehér differenciációt követően (B14,F14) alacsonyabb szinten, de kimutatható volt az UCP1 fehérje.

A mitokondriális oxidatív foszforiláció (OXPHOS) alapvető szerepet játszik a barna / „beige” adipociták energiatermelésében. A légzési lánc fehérjék nagyobb mértékben expresszálódnak barnult zsírsejtekben, mint fehérsejtekben. A PPAR γ -agonista elhagyását követően ezen fehérjék szintjének csak csekély mértékű csökkenését eredményezte, ami arra utal, hogy a mitokondriumok kis része eltávolítódik. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a „beige” fenotípust az SGBS-sejtekben befolyásoló jelátviteli útvonalak legalább két egymást követő héten fenntarthatók, még akkor is, ha a rosiglitazon eliminálódik a differenciációs tápfolyadékból.

4.6. A browning koktél az IL-8, IL-6 és MCP1 citokinek emelkedett szekrécióját eredményezte, a fehér zsírsejtekhez viszonyítva

Ezenkívül a citokinek szekrécióját vizsgáltuk humán SGBS sejtekben: az IL-8, IL-6, IL1 β , TNF α és MCP-1-t ELISA-val mértük. Sem a differenciálatlan, sem a differenciált adipociták nem szekretálnak TNF α -t és IL-1 β -t. A nem differenciált preadipocitákban az IL-8, IL-6 és a monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP1) szintjét mutattuk ki viszonylag magas szinten. Érdekes, hogy ezeknek a citokineknek a szekréciója szignifikánsan nagyobb volt a „beige”

adipociták által. Az irisin kezelés megnövekedett IL-8 és IL-6 termelést eredményezett, azonban nem befolyásolta az MCP1 szekréciót.

4.7. Az IL-6 receptor folyamatos gátlása csökkent UCP1 expresszióhoz és extracelluláris acidifikációhoz vezet „browning” differenciáció alatt.

A barnult adipociták termogenikus, noradrenerg aktiválása összhangban van a megnövekedett IL-6 expresszióval. Nemrégiben megvizsgáltuk a humán zsírszövet minták és primer adipociták citokin szekrécióját, és azt találtuk, hogy az IL-6 szekréció a beige differenciálódási program végéig fenntartható. Egy antitest segítségével megvizsgáltuk az IL-6 receptor alfa folyamatos blokkolásának hatását a differenciálódó hADMSC-kben. Majd LSC módszerrel kimutattuk az egyes adipociták textúráját és UCP1 fehérjetartalmát. A blokkoló antitestet alkalmaztuk a PPAR γ -vezérelt „browning” differenciációs protokoll során, amely megemelkedett „texture sum variance”-t eredményezett, amely nagy méretű lipidcseppekkel társult, míg az *Ucp1* átlagos intenzitása csökkent. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a differenciáció a fehér zsírsejt képződés irányába tolódott el.

4.8. A TG2 magasabb szinten expresszálódik barnult adipocitákban, és az inhibitora jelenlétében mind a TG2, mind az UCP1 expresszió csökken.

A hosszú távú kísérlet során a TG2 gén- és fehérje expresszióját is elemeztük. Eredményeink azt mutatják, hogy a *Tg2* magasabb szinten expresszálódik a barnult SGBS adipocitákban. Ezenkívül a TG2 expresszió korrelál az UCP1 expresszióval, mRNS és fehérje szintjén is. Az NC9 egy membránon áthatoló, irreverzibilis site-specifikus gátlószere a TG2-nek. Az NC9 kezelés eredményeként - akár 9 órán át, akár 21 napig - differenciált barna SGBS adipocitákban megfigyeltük, hogy mind a *Tg2*, mind a *Pm20d1* gén expressziója szignifikánsan csökkent a kezeletlen barnult adipocitákhoz képest. A barnult adipocitákon végzett 21 napos NC9 kezelés az *Ucp1* szignifikánsan alacsonyabb expressziójához vezetett. Fehér adipociták esetén nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget az NC9 kezelt és a kezeletlen sejtek között. Továbbá

vizsgáltuk a TG2 és az UCP1 fehérje expresszió változásait a fehér és a „browning” differenciálódási koktél hatására, NC9 kezelés jelenlétében (9 órán keresztül vagy 21 napig adva) vagy hiányában. A 21 napos NC9 kezelés szignifikánsan csökkentette a TG2 fehérje expresszióját a differenciált barnult adipocitákban. Hasonló tendenciát figyeltünk meg az UCP1 fehérje expressziója esetén is.

5. MEGBESZÉLÉS

1. Barna zsírszövet eloszlása az emberi testben és a humán hasfali szubkután zsírszövetből (hADMSC) izolált sejtek „browning” folyamatának tanulmányozása

A BAT lehetővé teszi az emlősök számára az állandó testhőmérséklet fenntartását nem-didergéses hőtermelés révén. A barna és “beige” adipociták hőtermelésének kulcsfontosságú közvetítője az UCP1, amely az IMM-ben található, ahol szétkapcsolja a sejtek légzését az ATP termeléstől. Bizonyos ingerek, például hideg hatására a NE aktiválja a β 3-adrenerg jelátvitelt a barna adipocitákon, ami kiváltja a szabad zsírsavak felszabadulását és az UCP1 későbbi aktiválódását. A “beige” adipociták mitokondriumaiban nemrégiben leírtak egy hatékony UCP1-független hőtermelő mechanizmust, amelyet a kreatin ciklus közvetít.

A termogenikusan aktív területekben intenzív a szénhidrát-anyagcsere, így ezen szövetekre jellemző a fokozott fluorodeoxiglükóz (^{18}F -FDG) felvétel, ami jól látható a PET/CT felvételeken, különösen felnőtt emberi szervezetben kimutatja a hideg által indukált barna zsírszövetet. A humán zsírsejtek „browning” folyamatának megértéséhez legszélesebb körben alkalmazott *ex vivo* rendszer a humán hasfali szubkután zsírszövetből származó ADMSC-k használata.

2. Léteznek olyan humán preadipocita sejtvonalak, amelyeknek bizonyos tulajdonságai összefüggésben vannak barnulási képességükkel.

Az emberi csecsemő barna zsírszövetéből izolált és SV40 T és t antigénnel transzformált PAZ6 sejtek képesek voltak differenciálódni barna adipocitákká *in vitro*. Egy másik kutatócsoport, Xue és mtsai négy páciens szupraklavikuláris régiójából immortalizációs eljárással generált humán preadipocita sejtvonalakat. A mély nyaki zsírból származó preadipocita klónok képesek voltak funkcionális termogenikus adipocitákká differenciálódni és reagáltak a BMP7 kezelésre. Egy másik tanulmányban Shinoda és mtsai 65 preadipocita klón szupraklavikáris zsírbiopsziákból történő differenciációját vizsgálta. Megállapították, hogy

olyan génexpressziós jellegzetességeket mutatnak, amelyek a termogén adipociták “beige” típusához hasonlítottak.

3. SGBS sejtek “browning” folyamatának vizsgálata más csoportok által.

Az SGBS humán preadipocita sejtvonalat gyakran használják reprezentatív modellként az emberi zsírsejtek tanulmányozására, és korábban a fehér zsírsejt differenciáció reprezentatív modelljének tekintették. Az első eredmények azt mutatják, hogy az SGBS-sejtek differenciálthatók termogénikus adipocitákká. A fehérje adipocitákká differenciálódott 2-oxoglutarát-függő dioxigenáz (*Fto* gén által kódolt) hiányos SGBS preadipociták megnövekedett UCP1 expressziót és szétkapcsolt légzést mutattak. Később Tews és mtsai megállapították, hogy a TENM2 (teneurin-2), amely gátolja a klasszikus barna zsírszövet markert, a Zic1-et, fehér adipocita progenitor sejtekben felhalmozódik. Megvizsgálták az SGBS sejteket TENM2 le-regulálással, géncsendesítés segítségével, amely az UCP1 növekedéséhez vezetett mRNS és a fehérje szintjén is. Ezen tanulmányokkal és az itt bemutatott eredményekkel ellentétben Guennoun és mtsai megállapították, hogy az SGBS adipociták megváltoztatják fenotípusukat egy négyhetes differenciálási program során. Két héten belül magas UCP1 expressziót és termogén fenotípust mutattak, fehér differenciálódási protokoll eredményeként anélkül, hogy barnulást indukáló anyagot adtak volna hozzá. Ezután a további két hétig tartó differenciáció eredményeként az UCP1 fehérje expressziója jelentősen lecsökkent. Egy másik tanulmány látszólag megerősítette ezeket az eredményeket, amelyben összehasonlították a differenciálódott SGBS és hADMSC-eredetű szubkután adipociták génexpressziós mintázatát. Megfigyelték, hogy az UCP1 fehérje expressziója magas volt az SGBS sejtekben, amelyeket 12 napig differenciáltattak, még akkor is, ha a roziglitazont vagy a T3-at nem adtak a tápfolyadékhoz.

4. Az SGBS sejtek képesek barna vagy “beige” zsírsejteké differenciálódni roziglitazon, irisin vagy BMP7 hatására.

Lézer-pásztázó citometria és funkcionális vizsgálatok alkalmazásával arra törekedtünk, hogy megvizsgáljuk, vajon a klasszikus barna vagy “beige” adipocita differenciáció (“browning”) indukálható-e az SGBS sejtekben. Kísérleti eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy a PPAR γ -által szabályzott “browning” protokoll (beleértve a roziglitazont) és az irisin-kezelés sikeresen alkalmazható az SGBS adipocitáknál “browning” kiváltására, ami “beige” fenotípust eredményez. Eredményeink azt sugallják, hogy az irisin, a már elkötelezett „beige” preadipociták vagy multipotens progenitorok barnulását idézi elő. A BMP7 alkalmazása mérsékeltebb hatással volt, és különálló génexpressziós programot indukált a “beige” szelektív markerek, a *Tbx1* és a *Cited1* fel-regulálódása nélkül. Továbbá a *Pparg* és a *Zic1* fokozott expresszióját eredményezte, ami arra utal, hogy ez a mediátor inkább klasszikus barna-szerű differenciációt indukál. A funkcionális vizsgálatok UCP1-függő hőtermelést és nagymértékű extracelluláris savasodást detektáltak barnult adipociták esetén. A hőtermelő adipociták ezenfelül UCP1-független termogenikus mechanizmusokkal is rendelkeznek. A kreatin metabolizmusban fellelhető szubsztrát ciklust nemrég azonosították, mely hozzájárul a beige sejtek mitokondriumaiban az energia leadásához. Sikerült bebizonyítanunk a kreatin ciklus indukcióját β -adrenerg stimulusra reagálva, „beige” SGBS adipocitákban.

5. Az FTO lókuszt a bész vagy a potenciális “masked beige” zsírsejtekkel van kapcsolatban.

Minden egyén eltérő életmóddal, étrenddel és genetikai háttérrel rendelkezik, például akik az FTO lókuszt egy gyakori rizikó-allélt hordozzák, elhízásra lesznek hajlamosak, mivel a bennük lévő adipocita előalakok kisebb mértékben tudnak “beige” differenciáció irányba elköteleződni. A mitokondriális hőtermelés lehetősége csökkent azokban az egyéneknél, akik hordozzák az európai populációban magas gyakorisággal (kb. 44%) előforduló C rizikó allélt.

A hőtermelő képesség esetleg fokozható “browning”-ot indukáló mediátorok segítségével, vagy érett “masked” illetve aktivált „beige” zsírsejtek transzplantációjával.

Ebben a tanulmányban leírtuk, hogy az SGBS sejtvonal a C rizikó allél egy példányát hordozza; ezek a preadipociták mégis képesek voltak differenciálódni funkcionális “beige” adipocitákká, amennyiben a “browning” ingerek (például roziglitazon vagy irizin kezelés) folyamatosan jelen voltak.

6. SGBS sejtek és hADMSC-k citokin szekréciójának vizsgálata.

Az SGBS-sejtekkel összhangban vizsgáltuk, hogy a “browning” indukálói hogyan hatnak a hADMSC-kre. Az irisin hADMSC-kre és SGBS sejtekre gyakorolt hatását összehasonlítva, a kezelés pozitív hatással volt az IL-6, MCP-1 és IL-8 szekréciójára hADMSC-kben, valamint az SGBS sejtek IL-8 termelésére, fehér kontroll-adipocitákhoz hasonlítva.

Az adipociták differenciálódásának végéig csak az IL-6 termelődése maradt fenn. Betegekben az IL-6 farmakológiai blokádjá súlygyarapodást eredményezett, amely részben magyarázható a csökkent “browning”-al, amelyet az auto / parakrin IL-6 jelátvitel gátlása váltott ki. Megvizsgáltuk az IL-6 receptor auto/parakrin hatásának gátlását, és megállapításaink azt sugallják, hogy a gátlás csökkentette az adipociták “beige” fenotípusát.

7. A transzglutamináz 2 (TG2) és gátlószerének szerepe az SGBS adipocita differenciációban.

A humán zsírszövetek génexpressziós profiljára összpontosító vizsgálatok azt mutatták, hogy a barna zsírszövetben a *Tg2* expresszió hatszor magasabb, mint a fehér zsírszövetben, feltehetően azt sugallja, hogy a *Tg2* részt vesz a zsírszövetek termogenikus funkciójában. Korábban munkacsoportunkban vizsgáltuk a *Tg2* génexpressziós profilját a human mély nyakból (DN) és a szubkután nyaki (SCN) izolált zsírszöveti mintákból. Megállapították, hogy a *Tg2* génexpressziója magasabb a mély nyaki mintákban, mint a nyaki bőr alatti zsírszövetben. Hosszú távú kísérletünk során a TG2 expresszióját is vizsgáltuk. Eredményink azt mutatják,

hogy a TG2 magasabb szinten expresszálódik a barnult SGBS adipocitákban, akár mRNS, akár fehérje szinten. Megvizsgáltuk az NC9 (α-N-carbobenzyloxy-ε-N-acryloyl-L-lysine(2-(2-dansylaminoethoxy)ethoxy)ethanamide hatását, amely a TG2 gátlószere. Ezen útvonal jelentősége a “beige” adipociták metabolizmusában továbbra sem tisztázott, az adatok azonban egyértelműen azt mutatják, hogy a TG2 fontos szerepet játszik a barnult adipocitákban, és az NC9 hatással van rájuk.

6. TÁRGYSZAVAK

SGBS adipociták, human preadipocita, roziglitazon, irisin, browning, beige, termogenezis, differenciáció, elhízás, citokinek

7. ÖSSZEFOGLALÁS

- Eredményeink arra utalnak, hogy az SGBS-sejtek könnyen és értékes modellként alkalmazhatók a human zsírsejtek *in vitro* tanulmányozáshoz.
- Az SGBS preadipociták egy nem-elköteleződött preadipocita stádiumot képviselnek egy FTO rizikó alléllal, amelyek képesek fehér vagy barnult adipocitákká differenciálódni.
- A rosiglitazon vagy irisin kezelés eredményeként a “browning” indukciója sikeres volt az SGBS sejtekben, amelyek a “beige” útvonalat követik. A “beige” jelenség indukcióját a barna és a “beige” marker gének (*Ucp1*, *Cidea*, *Elovl3*, *Ppar γ* , *Cycl*, *Tbx1*, *Pm20d1*) fokozott expressziója, a mitokondriumok felhalmozódása, a multilokuláris morfológia bizonyítja, és ezek a tulajdonságok szorosan kapcsolódnak cAMP hatására kialakuló magas oxigénfogyasztással
- Különböző időpontokban követhetjük az SGBS adipocita differenciálódását, és “browning” folyamatát lézer pásztázó citométer segítségével. Mérésünk kombinálta a lipidcseppek méretét és számát, valamint az UCP1 fehérje tartalmát.
- A BMP7 adása azonban az *Ucp1*, *Cidea*, *Pgc1 α* , *Ppar γ* és *Zic1* génexpressziójának felregulálódásához vezetett a kezeletlen sejtekhez képest, amely a klasszikus barna adipociták tulajdonságainak megjelenését idézi elő.
- A kreatin-foszfát ciklus hőtermelésben való szignifikáns részvételét figyeltük meg barnult SGBS adipocitákban, melyet a rosiglitazon, irisin vagy BMP7 kezeléssel értünk el, jelentősen emelkedett oxigén fogyasztást detektáltunk β -adrenerg stimulus eredményeként.
- Hosszú távú kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy ha a “browning” induktor, a rosiglitazon kihagyásra kerül a differenciációs tápfolyadékból, az UCP1 expressziója és a mitokondriális feldúsulás részben fenntartható.

- A “beige” (barnult) SGBS zsírsejtek több IL-6, IL-8 és MCP1 citokint szekretálnak.
- Az IL-6 receptor folyamatos gátlása csökkentette a human primer adipociták “beige” fenotípusát, a blokkolása eredményeként azt találtuk, hogy sem az alap, sem a stimulált, sem a protonszivárgásos oxigénfogyasztás nem csökkent jelentősen. Ennek ellenére az ECAR szignifikánsan alacsonyabb volt a gátolt sejtekben.
- A Transzglutamináz-2 magasabb szinten expresszálódik a barnult SGBS adipocitákban, ami korrelál az UCP1 expresszióval gén és fehérje szintjén is.
- A transzglutamináz inhibitor rövid vagy hosszú távú alkalmazása csökkentette a *Tg2* gén expresszióját. A TG2 hosszú távú gátlása az Ucp1 expressziójának szignifikánsan alacsonyabb szintjét eredményezi a barnult SGBS sejtekben.
- A génexpresszió eredményeivel összhangban a hosszú távú inhibitorral történő kezelés során szignifikánsan csökkent TG2 és UCP1 fehérje expresszió volt megfigyelhető. A funkcionális tesztben azonban nem tudtunk észlelni jelentős változásokat a transzglutamináz gátlószerének hatására.



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/348/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Klusóczy Ágnes

Neptun kód: E5EAEN

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10056744

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Klusóczy, Á.**, Veréb, Z., Vámos, A., Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Bacsó, Z., Fésüs, L., Kristóf, E.: Differentiating SGBS adipocytes respond to PPAR γ stimulation, irisin and BMP7 by functional browning and beige characteristics.
Sci. Rep. 9 (1), 1-35, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42256-0>
IF: 4.011 (2018)
2. Kristóf, E., **Klusóczy, Á.**, Veress, R., Shaw, A., Combi, Z., Varga, K., Győry, F., Balajthy, Z., Bai, P., Bacsó, Z., Fésüs, L.: Interleukin-6 released from differentiating human beige adipocytes improves browning.
Exp. Cell Res. 377 (1-2), 47-55, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.02.015>
IF: 3.329 (2018)





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

További közlemények

3. Kristóf, E., Doan-Xuan, Q. M., Sárvári, A. K., **Klusóczy, Á.**, Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Bacsó, Z., Bai, P., Balajthy, Z., Fésüs, L.: Clozapine modifies the differentiation program of human adipocytes inducing browning.
Transl. Psychiatry. 6 (11), 1-12, 2016.
IF: 4.73

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,07

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,34**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.10.18.



8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Elsősorban a témavezetőmnek, Dr. Fésüs László Professzor Úrnak szeretném kifejezni őszinte hálámat a Ph.D. tanulmányaim alatt nyújtott folyamatos támogatásért, motivációért, valamint az értékes szakmai megbeszélésekért. Köszönettel tartozom a lehetőségért, hogy a munkacsoportjában tanulhattam és dolgozhattam. Különösen hálás vagyok Dr. Kristóf Endrének, hogy konstruktív tanácsaival, szakmai megbeszélésekkel folyamatosan segített engem, sok mindent tanulhattam tőle. Köszönetem szeretném kifejezni a Sejtbiokémia Munkacsoport minden jelenlegi és múltbéli tagjának a barátságos munkahelyi légkörért. Külön köszönet Dr. Szatmári-Tóth Máriának a folyamatos segítségért, tapasztalatainak megosztásáért. Köszönet illeti Nagy Jennifer, Klem Attiláné és Nagy Anikó asszisztensi tevékenységét, melyek nagyban segítettek kísérletes munkámat. Hálás vagyok kollaborációs partnereinknek: Dr. Bacsó Zsoltnak, Dr. Bai Péternek és Dr. Veréb Zoltánnak nyújtott segítségükért a lézer-pasztázó képkalkotásban és elemzésben illetve a sejtes respirációs mérésekben, valamint multiparametriás analízisekben, továbbá németországi kollaborációs partnereinknek: Prof. Dr. Martin Wabitsch-nak és Prof. Dr. Pamela Fischer-Posovszky-nek az SGBS sejtvonalért és mintákért. Köszönet illeti az egyetemi hallgatók (Combi Zsolt, Vámos Attila és Vinnai Boglárka) munkáját is, akikkel együtt dolgozhattam kísérleteim során. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Tőzsér Józsefnek, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet jelenlegi vezetőjének a lehetőségért, hogy ebben az Intézetben dolgozhattam. Végezetül, minden egyes munkatársamnak szeretném hálámat kifejezni a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben. Hálával tartozom kollegáimnak és drága barátaimnak, kedvességükért és támogatásukért. A legnagyobb köszönettel és hálával, szeretett családomnak tartozom, akik folyamatosan bátorítottak és átsegítettek a nehéz időkön.